

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie

# LA THÈSE DE DOCTORAT ÈS-SCIENCES NATURELLES

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE PARIS

PAR

**GHIDALIA Walter**

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES

---

Sujet de la Thèse : Étude électrophorétique et immuno-  
chimique du sérum d'un Crustacé  
Décapode : *Macropipus puber* (Linné).  
Application à l'immunochimie systé-  
matique des Crustacés.

Soutenue le 9 Mai 1968 devant la commission d'examen :

|                           |                |
|---------------------------|----------------|
| M. DRACH                  | Président      |
| M <sup>lle</sup> STAUB    | } Examinateurs |
| MM. POSSOMPÈS<br>VENDRELY |                |

---

PARIS

Imprimerie ROBIN & MAREUGE

7, CITÉ DE GÈNES, 7  
1969



# ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE ET IMMUNOCHIMIQUE DU SÉRUM D'UN CRUSTACÉ DÉCAPODE *MACROPIPIUS PUBER* (LINNÉ). — APPLICATION A L'IMMUNOCHIMIE SYSTÉMATIQUE DES CRUSTACÉS.

par

Walter Ghidalia

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences de Paris.

## Résumé

Le sérum d'un Crustacé Décapode, *Macropipus puber* (Linné), a été étudié du point de vue de sa composition en protéines. La présence de plusieurs constituants immunologiquement différents a été mise en évidence et les répercussions de cet état de fait sur l'application des techniques immuno-chimiques à la systématique du groupe des Crustacés, ont été examinées.

L'hémocyanine est une métalloprotéine à fonction respiratoire qui se rencontre dans l'hémolymphe de certains ordres de Mollusques et d'Arthropodes. Bien que connue depuis plus d'un siècle, sa structure et ses propriétés posent encore de nombreux problèmes, son activité respiratoire elle-même ayant parfois été contestée. La présence de cuivre au sein de sa molécule est, par contre, admise sans réticence. Ce sont surtout les hémocyanines de Gastéropodes (*Helix* et *Busycon* essentiellement) et de Xiphosures (Limule) qui ont été le plus étudiées, celles de Crustacés ne sont l'objet de travaux suivis que depuis une trentaine d'années.

La plupart des auteurs ayant travaillé sur le sérum des Crustacés Décapodes considèrent l'hémocyanine comme la principale, sinon l'unique, protéine sérique (Goodwin, 1960). Cette opinion, communément admise depuis fort longtemps, reçut un semblant de confirmation à la suite des travaux d'Allison et Cole (1940) et de Clark et Burnet (1942).

En effet, dosant simultanément, chez deux espèces de Crustacés, *Homarus americanus* et *Cancer borealis*, le cuivre et l'azote présents dans le sérum et dans l'hémocyanine purifiée, obtenue soit par précipitation isoélectrique, soit par électrodialyse, Allison et Cole constatent que les valeurs du rapport cuivre sur azote sont voisines dans les deux cas. Ils en déduisent, qu'après élimination du caillot, il ne subsiste

dans le sérum que de l'hémocyanine. Une conclusion analogue se dégage des recherches de Clark et Burnet. L'épuisement d'un immun-sérum anti-sérum total de *Jasus lalandii* par l'hémocyanine du même animal, entraîne la disparition de la totalité des anticorps contenus dans l'immunsérum.

Pourtant, l'utilisation ultérieure de techniques d'analyses plus fines que celles dont disposaient les premiers auteurs, fit rapidement pressentir que le sérum des Crustacés Décapodes, loin d'être monoprotéique, devait posséder en fait une composition bien plus complexe.

Le présent article expose les conclusions d'un cycle de recherches consacré à l'étude des protéines sériques d'un Crustacé Brachyoure : *Macropipus puber* (Linné). La discussion des résultats, ainsi que la description détaillée des modalités techniques seront présentées dans des publications ultérieures. Chacune de celles-ci sera consacrée à un aspect particulier, enzymatique, immunochimique, spectrophotométrique entre autres, de ce problème.

La première partie traite de la composition du sérum, telle qu'elle apparaît après séparation électrophorétique et du problème de la localisation des fractions hémocyaniques sur les électrophorégrammes ainsi obtenus.

La seconde partie est consacrée à l'analyse immunoélectrophorétique de ce même sérum et au dénombrement des protéines immunologiquement différentes qui le constituent.

La troisième partie constitue un examen critique, à la lumière des faits exposés dans les deux précédents chapitres, des données systématiques déjà obtenues par immunochimie chez les Crustacés.

## I. ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM DE *MACROPIPIUS PUBER*.

Les prélèvements ont été effectués sur des individus mâles, exclusivement. Une telle façon de procéder, qui exclut d'emblée toutes les substances protéiques et glycoprotéiques impliquées dans les processus d'ovogénèse, rend plus aisée l'interprétation des électrophorégrammes.

Toutefois, une importante cause de variation dans la composition de l'hémolymph, imputable au mode de croissance des Crustacés, subsiste en dépit de cette précaution. En effet, au cours du cycle d'intermue, intervalle de temps séparant deux mues successives, l'hémolymph subit des changements de concentration dont l'amplitude peut varier dans le rapport de 1 à 10. Aussi, la référence à un stade ou à une période déterminée du cycle d'intermue constitue-t-elle une condition nécessaire à une comparaison valable entre différents individus.

Les électrophorèses ont été effectuées sur des supports divers. Les uns, qualifiés d'inertes, gel d'agarose par exemple, présentent une texture lâche qui n'entrave pas la libre circulation des protéines. Les autres, dits sélectifs, sont confectionnés avec des substances telles l'acrylamide, l'amidon ou le Sephadex, qui possédant des propriétés



filtrantes, fournissent des gels à l'intérieur desquels la taille des molécules conditionne le déplacement. La répartition des fractions sur l'électrophorégramme s'effectue alors en fonction de deux caractéristiques des protéines étudiées :

- leur charge électrique (comme sur support inerte) ;
- la dimension de leurs molécules.

On conçoit aisément que, dans ces conditions, la séparation des différents constituants soit plus poussée que sur support inerte.

Des essais préliminaires effectués avec différents tampons (borate, véronal, Tris-glycine, Poulick) et sur des supports filtrants variés (gel d'amidon, Sephadex G 200-agarose, Sephadex G 200-agarose-amidon, acrylamide-agarose) ont permis de préciser les conditions expérimentales optimales. Pour un gel donné, l'utilisation d'un système de tampons discontinus améliore le fractionnement. Les meilleures résolutions ont été obtenues avec les gels de Sephadex G 200-agarose-amidon et acrylamide-agarose. Ce dernier support, qui permet une séparation très poussée des différents constituants du sérum humain, nécessite, du moins en ce qui concerne son application à l'hémolymphe des Crustacés, des mises au point supplémentaires. Aussi, la quasi-totalité des expériences dont les résultats vont être maintenant exposés, a-t-elle été effectuée sur support de Sephadex G 200-agarose-amidon. Les électrophorèses ont été réalisées en système de tampons discontinus (Tris-glycine, pH 8,7), les migrations s'effectuant à 4° pendant seize heures sous une tension de 5 V/cm.

Examiné dans ces conditions expérimentales, le sérum de *M. puber* mâle se résoud en quatorze fractions protéiques qui toutes présentent une migration anodique. Leur importance quantitative dépend de l'étape atteinte par l'animal considéré.

#### A. Mise en évidence de l'hétérogénéité de composition du sérum.

La comparaison d'électrophorégrammes de sérum prélevés sur des crabes parvenus à différentes étapes du cycle d'intermue, montre clairement que les modifications de composition subies par l'hémolymphe au cours de ce même cycle, sont, non seulement d'ordre quantitatif, mais également qualitatif. Cela est particulièrement net dans le cas d'une fraction située sensiblement vers le milieu de la longueur totale de l'électrophorégramme. Très bien représentée dans le sérum des crabes en stade D, elle décroît après l'exuviation pour disparaître en fin de stade B. Elle est pratiquement absente pendant la plus grande partie du stade C et ne réapparaît dans le sérum que vers la fin de l'étape C<sub>4</sub> ou plus généralement en début de D<sub>0</sub>.

Cette dernière étape constitue un moment important du cycle d'intermue : elle correspond à l'époque où débutent les processus physiologiques qui aboutissent à la sécrétion d'une nouvelle carapace. La simultanéité remarquable qui se manifeste entre le déclenchement de ces processus et l'apparition sur les électrophorégrammes de sérum d'une fraction protéique supplémentaire laisse penser que le ou les constituants de celle-ci sont impliqués dans l'élaboration du nouveau tégument.

Afin de vérifier cette hypothèse, les protéines contenues dans les téguments calcifiés d'une part, l'hypoderme d'autre part, ont été extraits par des techniques appropriées. Les protéines de la carapace ont été recueillies au moyen d'une solution alcooloborée (Trim, 1941) à partir de boucliers dorsaux préalablement décalcifiés par de l'acide chlorhydrique à 2 p. 100 (Lafon, 1948). L'extrait ainsi obtenu est analysé en électrophorèse, parallèlement à un sérum témoin. Il se résoud en six à sept fractions qui, au terme de leur migration, viennent se placer sensiblement à la même hauteur que certaines fractions du sérum de référence. Cette contiguïté dans l'espace ne permet pas à elle seule d'homologuer entre elles les fractions présentant une migration synchrone. Tout au plus peut-on admettre que les protéines constitutives de ces fractions possèdent une charge électrique analogue et, puisqu'il s'agit de supports filtrants, des tailles moléculaires voisines. Aussi, le recours à une technique permettant de s'assurer de l'identité des fractions contiguës, s'impose-t-il. Un tel contrôle est aisément réalisable par l'emploi de méthodes immunochimiques.

L'extrait tégumentaire mis en présence d'un immunsérum anti-sérum total de *M. puber*, sérum contenant des anticorps dirigés contre toutes les protéines sériques de ce Crustacé, ne détermine l'apparition d'aucun précipité (Planche 1, B). Plusieurs raisons peuvent motiver cette absence de réactivité :

- les antigènes contenus dans l'extrait ont une structure radicalement différente de celles des antigènes sériques ;

- la ou les protéines présentes dans le tégument calcifié ont été dénaturées durant l'extraction ;

- la dénaturation de ces mêmes protéines s'est produite bien avant l'extraction lors du durcissement du tégument qui résulte du tannage d'une protéine hydrosoluble de l'épiderme par une quinone présente dans l'hémolymphe.

Il est difficile, dans l'état actuel du problème, de rapporter avec certitude le manque de réaction à l'une d'entre elles. Toutefois, si l'une de ces deux dernières hypothèses s'avérait véridique, l'absence de réaction ne signifierait rien car il est normal qu'aucun précipité n'apparaisse lorsque la confrontation est réalisée avec des produits de dégradation ; cela même si les protéines dont ils dérivent étaient à l'origine de même nature que les protéines sériques. Aussi est-il difficile actuellement de savoir si les protéines qui participent à l'édification du tégument calcifié sont semblables à celles qui constituent la fraction signalée sur les électrophorogrammes de sérum.

Les recherches ont alors été orientées vers les protéines de l'hypoderme, tissu immédiatement sous-jacent au tégument calcifié et qui secrète la trame protéique de ce dernier. Ces protéines s'obtiennent très facilement par simple macération, dans de l'eau distillée, de fragments d'hypoderme préalablement débarrassés, par un lavage soigneux, de tout fragment d'organe sous-jacent ou de liquide d'imbibition. Soumis à l'électrophorèse, cet extrait manifeste la présence d'une importante fraction protéique qui se place au même niveau que la fraction supplémentaire d'un sérum témoin.

Etudié par analyse immunoélectrophorétique et confronté pour cela à un immunsérum anti-sérum total de *M. puber*, l'extrait hypo-

dermique réagit en déterminant l'apparition d'un arc de précipitation (Planche 1, A). Il renferme donc une substance possédant apparemment la même structure qu'une des protéines sériques. Mais un certain doute subsiste néanmoins car la réaction de précipitation n'est pas strictement spécifique. Bordet a montré que les anticorps pouvaient réagir, non seulement avec leur antigène homologue, mais, également, avec d'autres antigènes, à condition toutefois que ces derniers présentent des analogies structurales avec l'antigène homologue. Cette réaction dite « croisée » rend moins certaine toute identification de substance basée sur une réaction de précipitation.

Cette incertitude est cependant levée lorsque l'analyse est pratiquée en milieu gélifié selon la méthode d'Ouchterlony (1948). En effet, lorsque la confrontation entre antigènes et anticorps s'effectue en un tel milieu, les précipités affectent la forme de lignes ou d'arcs. Le degré d'affinité structurale existant entre différents antigènes se déduit alors facilement du type de liaison que ces arcs contractent entre eux.

— Lorsque les extrémités voisines de deux arcs s'unissent entre elles, les antigènes responsables de leur formation sont identiques.

— Si l'extrémité d'un arc rejoint l'arc voisin, mais que l'extrémité propre de celui-ci demeure indépendante, les deux antigènes possèdent une structure voisine mais non identique (réaction croisée).

Cette méthode a été appliquée conjointement à l'extrait hypodermique et à un sérum témoin afin de s'assurer que la précipitation constatée n'était pas due à une réaction croisée. Un net raccordement réciproque entre l'arc induit par l'extrait hypodermique et un des arcs qui se développent en face du réservoir contenant le sérum de référence, peut alors être observé. La protéine extraite de l'hypoderme est donc également présente dans le sérum. Le fait qu'elle y soit moins abondante plaide en faveur d'une nature non hémocyanine. Cette substance est en effet dépourvue de cuivre, les examens sont tous probants à cet égard ; dans la perspective d'une composition mono-protéique du sérum, il ne pourrait donc s'agir que d'apohémocyanine.

Or, il est difficile de concevoir les raisons pour lesquelles la partie protéique du pigment respiratoire présenterait un tel phénomène d'accumulation préférentielle au niveau de l'hypoderme ; au reste, hémocyanine et apohémocyanine possédant la même structure, les arcs de précipitation qui leur correspondent, devraient se rejoindre. Or, au cours des analyses immuno-chimiques, les arcs qui apparaissent en face de la fraction sérique contiguë à celle de l'extrait hypodermique, demeurent toujours indépendants. La protéine contenue dans l'extrait hypodermique est donc distincte de l'hémocyanine. Sa localisation dans un tissu qui joue un rôle important dans la synthèse des téguments, ainsi que son accumulation périodique à des moments où se prépare la prochaine mue, constituent des arguments sérieux en faveur de son homologation au matériel protéique impliqué dans l'élaboration de la nouvelle carapace. C'est là une preuve irréfutable de l'existence dans le sérum de Crustacé d'au moins une protéine qui ne soit pas de nature hémocyanine. Ainsi, par ce biais, se trouve posé le problème de l'identification des fractions hémocyaniques sur les électrophorogrammes de sérum.

## B. Localisation des fractions hémocyaniques.

Trois types de techniques s'appuyant sur des propriétés attribuées classiquement à ce pigment respiratoire, peuvent être utilisées à cet effet :

1° Des techniques chimiques qui permettent la mise en évidence du cuivre hémocyanique sous la forme d'un composé coloré ;

2° Des techniques spectrophotométriques, l'hémocyanine présentant à l'état oxydé un maximum d'absorption vers 335 m $\mu$  ;

3° Des techniques enzymologiques, l'hémocyanine manifestant, comme la plupart des pigments respiratoires, des propriétés enzymatiques.

### 1° Par détection du cuivre.

Dans la molécule intacte d'hémocyanine, le cuivre se trouve à l'état masqué et demeure de ce fait inaccessible à ses réactifs habituels (Zuckerlandl, 1959). Cette perte des propriétés ioniques du métal, jointe à sa solubilité dans l'hémolymphe, montre que la partie protéique de l'hémocyanine (apohémocyanine) se comporte vis-à-vis du cuivre comme un agent chélateur. Aussi, la mise en évidence du cuivre hémocyanique nécessite-t-elle son activation préalable, c'est-à-dire le recouvrement, par le métal ainsi capté, de sa réactivité originelle. Cette opération, dont la nature est encore à l'heure actuelle assez mal connue, se traduit généralement par une dégradation plus ou moins poussée de la molécule du chélateur. Dans le cas de la plupart des cuproprotéines, un tel résultat s'obtient assez facilement par addition de petites quantités d'acides ou de bases à la solution du réactif. Le cuivre devient alors aisément repérable sur les électrophorégrammes ainsi traités.

Deux considérations rendent toutefois assez délicat le choix des réactifs :

- la faible spécificité de la plupart d'entre eux ;
- leur faculté de détection sélective qui ne s'exerce généralement qu'envers un état ionique déterminé du métal  $\text{Cu}^+$  ou  $\text{Cu}^{++}$ .

Cette seconde caractéristique implique la connaissance préalable de la forme ionique du cuivre hémocyanique. Or, cette question demeure encore, à l'heure actuelle, grandement controversée.

En effet, s'il est communément admis que le métal est cuivreux dans le pigment réduit, les opinions divergent fortement lorsqu'il est question de son état dans l'oxyhémocyanine. Pour certains auteurs, le cuivre hémocyanique, mis au contact de l'oxygène de l'air, ne subirait aucun changement de valence ; il demeure à l'état cuivreux. Le phénomène serait analogue à celui déjà constaté à propos d'un autre pigment respiratoire : l'hémoglobine. Dans les deux cas, il y aurait oxygénation et non pas oxydation du métal impliqué dans les processus respiratoires. Pour d'autres, par contre, une partie au moins, la moitié environ, des ions cuivreux présents dans l'hémocyanine réduite, se trouverait à l'état cuivrique dans l'oxyhémocyanine au sein de laquelle coexisteraient les deux états ioniques du métal.

Compte tenu des incertitudes touchant la forme du cuivre hémocyanique, les réactifs des deux états ont été utilisés simultanément. Parmi les réactifs testés, une dizaine environ, les meilleurs résultats ont été obtenus avec la dithiooxamide (acide rubéanique) et la cuprizone (bis-cyclo-hexanone-oxalyldihydrazone) pour l'ion cuivrique et la cuproïne (2-2' diquinolyle) pour l'ion cuivreux.

Des quatorze fractions protéiques visibles sur les électrophorogrammes de sérum de *M. puber* mâle réalisés en gel de Sephadex G 200-agarose-amidon et tampon tris-glycine, huit donnent généralement une réaction positive avec la dithiooxamide (Planche 2, A et B) et la cuprizone. Cela témoigne de la présence à leur niveau d'ions cuivriques. Un nombre variable de ces huit fractions, deux à cinq suivant le cas, réagissent également avec la cuproïne et contiennent, de ce fait, des ions cuivreux.

Les variations de potentiel électrique qui apparaissent lorsque l'hémocyanine passe de l'état oxydé à l'état réduit et réciproquement, étant vraisemblablement trop faibles pour être perçues sur les électrophorogrammes, il est probable qu'hémocyanine réduite et oxyhémocyanine coexistent au sein des mêmes fractions. En conséquence, dans les conditions expérimentales précédemment définies et avec les réactifs utilisés, l'hémocyanine semble représentée sur les électrophorogrammes de sérum de *M. puber* mâle par un nombre variable de fractions, le plus souvent compris entre deux et cinq.

Une telle pluralité des fractions hémocyaniques n'a rien de surprenant en soi. Chez *Helix pomatia*, deux formes différentes d'hémocyanine qualifiées respectivement de  $\alpha$  et  $\beta$  ont été mises en évidence dans l'hémolymphe (Brohult et Borgman, 1944 ; Lontie et Witters, 1966). De plus, à chacune de ces hémocyanines correspondent trois variétés moléculaires, la molécule normale et deux types de sous-unités dont les poids moléculaires sont égaux à la moitié et au 1/10 ou 1/12 de celui de la molécule originelle. Une telle multiplicité de variétés moléculaires et de types d'hémocyanine suffirait à expliquer la pluralité des fractions hémocyaniques observées sur les électrophorogrammes. Mais deux objections importantes rendent problématique cette identification. Toutes deux ont trait à la validité du critère utilisé.

La présence, dans la molécule d'oxyhémocyanine, de cuivre sous ses deux états ioniques, n'est pas reconnue unanimement. Toutefois, même si la réalité de ce fait était démontrée, son application à la localisation de l'hémocyanine devrait encore être assortie d'une certaine circonspection. En effet, l'hémocyanine n'est pas la seule cuproprotéine renfermant, à l'état oxydé, les deux variétés ioniques du cuivre. La céruloplasmine (Blumberg et coll., 1963), la laccase du *Rhus vernicifera* (Nakamura et Ogura, 1966) et l'acide ascorbique oxydase, entre autres, sont également dans ce cas.

Aussi, préalablement à l'utilisation de cette caractéristique, convient-il de s'assurer de l'absence de telles cuproprotéines, dans le sérum de Crustacés. Or, la présence de céruloplasmine serait des plus probables chez plusieurs Décapodes (Manwell et Baker, 1963). Du reste, la précédente énumération est loin d'être limitative car il n'est pas exclu que d'autres cuproprotéines encore mal connues présentent ce même caractère.

En conséquence, l'emploi des réactifs habituels du cuivre, s'il permet de localiser les fractions cupriques sur les électrophorégrammes de sérum, n'apporte aucune information sur leur nature exacte.

## 2° Par examen spectrographique.

Il est communément admis (Dhéré, 1920 ; Rawlinson, 1940) que l'oxyhémocyanine présente dans l'ultra-violet deux maximums d'absorption situés respectivement vers 280 et 345 m $\mu$ . Le premier, attribuable à la partie protéique du pigment, manifeste la présence de deux acides aminés : la tyrosine et le tryptophane, tous deux bien représentés dans la molécule d'hémocyanine (Roche et Jean, 1934). Le second, qui disparaît par réduction (Roche et Dubouloz, 1933), caractériserait le pigment à l'état oxydé.

L'examen à ces deux longueurs d'onde d'électrophorégrammes de sérum de *M. puber* mâle, préalablement rendus moins friables par une brève immersion dans l'alcool à 50°, permet de déceler une nette absorption à 345 m $\mu$ , au niveau des huit fractions cuproprotéiques précédemment mises en évidence par les réactifs du cuivre. Que l'hémocyanine puisse être représentée par autant de fractions est, on l'a vu précédemment, parfaitement admissible en raison de l'existence de différentes variétés moléculaires du pigment ; par contre, dans ce cas aussi, c'est le crédit qu'il convient d'accorder au critère d'identification utilisé qui doit être reconsidéré à la lumière des récents travaux portant sur diverses cupro-protéines.

En effet, une absorption préférentielle à des longueurs d'onde voisines de 350 m $\mu$  ne semble pas caractériser spécifiquement l'oxyhémocyanine. La laccase de *Rhus vernicifera* en présente une vers 330 m $\mu$  (Nakamura et Ogura, 1966) et la céruloplasmine humaine, vers 332 m $\mu$  (Blumberg et coll., 1963). Le même phénomène serait probable pour d'autres cupro-protéines, telles l'uricase, la polyphénol-oxydase bovine et l'amine oxydase dont les maximums d'absorption se situeraient respectivement vers 330, 340 et 380 m $\mu$ .

Or, il a été prouvé, à propos de la laccase de *Rhus vernicifera* (Nakamura et Ogura, 1966), que cette absorption était en rapport avec la présence d'ions cuivriques dans la molécule de l'enzyme. On comprend alors que, dans le cas des protéines sériques de *M. puber*, l'absorption à 345 m $\mu$  ait toujours été trouvée associée aux huit fractions qui donnent une réaction positive avec les réactifs de l'ion cuivrique.

Aussi, préalablement à toute tentative d'identification de l'hémocyanine par ses propriétés spectrophotométriques, convient-il de déterminer avec précision la longueur d'onde exacte à laquelle les ions cuivriques du pigment absorbent dans l'ultra-violet. Cette dernière condition est loin d'être remplie actuellement. Les chiffres les plus communément avancés dans la littérature s'échelonnant entre 333 et 346 m $\mu$ , la marge d'imprécision recouvre les maximums d'absorption de plusieurs cuproprotéines différentes. Cela résulte du fait que la quasi-totalité des recherches ayant trait à l'hémocyanine ont été réalisées avec des solutions de ce pigment dites purifiées mais qui devaient être en fait hétérogènes.

En effet, de nombreuses expériences dont les résultats seront

publiés ultérieurement, ont prouvé qu'aucun des procédés communément utilisés pour obtenir de l'hémocyanine à l'état pur, n'était susceptible d'effectuer cette opération. On obtient généralement une solution qui, examinée en électrophorèse, se résoud en un certain nombre de constituants protéiques et cuproprotéiques. La question du spectre d'absorption de l'oxyhémocyanine est donc à reconsidérer en tenant compte de ces faits.

### 3° Par la recherche d'activités enzymatiques définies.

Les activités enzymatiques classiquement attribuées à l'hémocyanine sont au nombre de trois :

- deux sont spontanées ; il s'agit des propriétés peroxydasiques (Ghiretti, 1956 ; Manwell et Baker, 1963) et catalasique (Ghiretti, 1956) ;
- la troisième, qui est d'ordre oxydasique, n'apparaît que lorsque la molécule d'hémocyanine a été préalablement dénaturée (Burk, 1940 ; Zuckerkandl, 1953).

Une activité estérasique, parfois associée aux fractions hémocyaniques présentes sur les électrophorégrammes de sérums d'un certain nombre de Crustacés et de Mollusques, a également été signalée par Cowden et Coleman (1962). Elle sera examinée dans une publication ultérieure traitant plus précisément des différentes propriétés enzymatiques manifestées par les protéines sériques de *M. puber*.

#### a. Activité peroxydasique.

Les résultats sont concordants quels que soient les substrats utilisés : benzidine, O.dianisidine, para-phénylène-diamine. Sur les électrophorégrammes de sérum de *M. puber* mâle, l'activité peroxydasique apparaît au niveau des fractions 1, 2, 3, 6, 7 et 8. Son intensité semble varier au cours du cycle d'intermue. Elle est surtout marquée au début de l'étape D<sub>1</sub>.

#### b. Activité catalasique.

Il n'a pas été possible de la mettre en évidence sur les électrophorégrammes réalisés en gel de Sephadex G 200-agarose-amidon, le dégagement des bulles d'oxygène qui permet ordinairement de localiser l'enzyme s'effectuant alors par toutes les faces du support.

Toutefois, cette opération est aisément réalisable lorsque l'électrophorèse est faite sur un support dépourvu d'amidon et constitué de Sephadex G 200 et d'agarose. On remarque alors des accumulations très nettes de bulles d'oxygène sur l'emplacement des deux principales fractions cuproprotéiques des électrophorégrammes ainsi obtenus. Le pouvoir de résolution de ce dernier support étant différent de celui du gel de Sephadex G 200-agarose-amidon, il est impossible dans l'état actuel du sujet, d'homologuer entre elles les fractions qui s'individualisent sur ces deux types de gels. De ce fait, les activités catalasiques constatées à propos de deux fractions cupriques séparées sur gel de Sephadex G 200-agarose, ne peuvent être rapportées à des fractions déterminées d'électrophorégrammes réalisés en Sephadex G 200-agarose-amidon. On peut néanmoins conclure de ces expériences qu'une activité catalasique, déterminée par des cuproprotéines, existe dans le sérum de *M. puber*.

*c. Activité oxydasique.*

Les fractions cuproprotéiques n° 1, 2, 3, 6, 7 et 8, qui sont les plus importantes, réagissent nettement avec les diphénols. Les réactions marquées avec le pyrocatechol sont discrètes avec l'adrénaline. Aucune réaction ne se manifeste envers le seul monophénol utilisé, en l'occurrence la tyramine. Les activités phénoloxydasiques et peroxydasiques apparaissent donc localisées dans les mêmes fractions. Une activité amino-oxydasique, variable selon les cas mais toujours très faible, est également perceptible au niveau des fractions 1, 2, 6 et 8.

L'intensité des réactions, appréciable approximativement à la teinte plus ou moins foncée de la coloration obtenue, ne varie pas lorsque le sérum analysé est préalablement soumis à un traitement dénaturant par l'urée (Zuckermandl, 1953) ou lorsqu'un activateur classique de la polyphénoloxydase des Insectes, l'oléate de sodium, est ajouté à la solution du réactif. L'emploi d'un inhibiteur pourtant usuel des oxydases, l'azothydrate de sodium, se révèle également inopérant et n'empêche pas la réaction de s'effectuer.

Il est difficile de savoir si l'absence totale de réactivité des fractions 4 et 5, qui sont aussi cupriques mais ne réagissent ni avec les phénols ni avec les amines, est normale ou imputable à leur faible importance quantitative.

Toutes ces activités, qu'elles soient phénoloxydasiques ou amino-oxydasiques, apparaissent spontanément sur les électrophorogrammes de sérum mis en présence des substrats appropriés, et cela même si les sérums examinés n'ont pas subi antérieurement à leur passage en électrophorèse, de traitement dénaturant. Il semblerait donc que, contrairement aux assertions de Burk et Zuckermandl, les propriétés oxydasiques de l'hémocyanine sont naturelles et ne résultent pas d'une dégradation préalable de la molécule du pigment. Il est toutefois possible qu'une telle dégradation se produise spontanément, soit durant certains processus physiologiques normaux, coagulation de l'hémolymphe par exemple, soit comme contre-coup de la méthode d'analyse utilisée. L'éventualité d'une légère dénaturation des cuproprotéines, consécutive au dégagement de chaleur provoqué par le passage du courant, ne peut être écartée d'emblée.

Enfin, il n'est pas exclu que l'activité enzymatique observée soit le fait d'une véritable oxydase. En effet, Manwell et Baker (1963) pensent avoir mis en évidence, dans le sérum de certains Crustacés, une cuproprotéine différente de l'hémocyanine, qui présente une nette activité oxydasique envers la dianisidine. De par sa nature, cette « dianisidine-oxydase » serait proche de la céruloplasmine du sérum humain, sinon identique.

Un fait constaté au cours de ce cycle d'expériences constitue peut-être une confirmation indirecte de cette thèse. Le nombre de fractions cupriques présentes sur les électrophorogrammes de sérum diminue lorsque le sérum examiné est préalablement filtré sur une colonne de Sephadex G 200. Les propriétés filtrantes de ce gel s'exerçant envers les substances dont le poids moléculaire est inférieur ou égal à 200 000 et celui de la céruloplasmine étant compris, selon les plus récentes estimations, entre 151 000 et 160 000, il est possible que la diminution du nombre des fractions cupriques résulte de la rétention de cette « dianisidine-oxydase » par le Sephadex G 200.

Au terme de cette étude consacrée aux activités enzymatiques de l'hémocyanine, il apparaît nettement que leur manifestation est étroitement conditionnée par la présence de cuivre. Il suffit pour s'en convaincre d'éliminer le métal par dialyse du sérum contre une solution de cyanure de potassium. On note alors une disparition concomitante de ces activités. Pourtant, le sérum ainsi traité donne des électrophorogrammes présentant le même nombre de fractions protéiques que ceux obtenus avec un sérum témoin, mais toutes celles qui correspondent aux cuproprotéines sont dépourvues de propriétés enzymatiques et ne réagissent pas lorsqu'on fait agir sur elles une solution de dithiooxamide. L'identité du métal impliqué dans ces réactions enzymatiques est, de ce fait, établie de manière indubitable. Néanmoins, deux incertitudes majeures subsistent toujours quant à l'origine et à la nature de ces activités.

La question se pose en effet de savoir si la totalité de ces activités n'est imputable qu'à la seule hémocyanine. En fait, la réponse positive qui lui a été constamment apportée jusqu'ici découle, force est de le reconnaître, de l'opinion déjà signalée selon laquelle l'hémocyanine serait sinon l'unique protéine sérique, du moins la seule cuproprotéine du sérum. Dans cette optique, il était inévitable que toute activité enzymatique, trouvée associée à la présence du cuivre, soit *ipso facto* attribuée à l'hémocyanine. Or, les faits rapportés à propos de l'activité oxydasique laissent prévoir la présence probable, dans le sérum, de cuproprotéines distinctes de l'hémocyanine mais également dotées de propriétés enzymatiques. En conséquence, le problème posé par les activités enzymatiques de l'hémocyanine ne pourra être résolu, en toute certitude, que lorsque l'expérimentation portera sur cette protéine obtenue aussi pure que possible.

Le second point concerne la nature exacte des activités enzymatiques observées et parfois la légitimité de leur qualification. Certes, les oxydases sont des cuproprotéines mais de nombreux auteurs s'accordent pour reconnaître que l'hémocyanine n'acquiert ses propriétés oxydasiques qu'après dénaturation et qu'elle est inactive à l'état normal. Zuckerkandl (1953) a même établi que l'activité manifestée par la protéine altérée disparaissait lorsque celle-ci était réintégrée dans sa structure initiale. Les essais réalisés sur les électrophorogrammes de sérum de *M. puber* ne permettent pas d'infirmer ni de confirmer ces thèses car, cela a déjà été signalé, il est possible que l'activité oxydasique apparemment spontanée qu'on y décèle, au niveau des fractions cuproprotéiques, résulte d'une éventuelle altération même légère, déterminée par le dégagement de chaleur provoqué par le passage du courant. Cette possibilité, s'ajoutant à l'absence de réaction observée lorsque les fractions cuproprotéiques sont confrontées à un inhibiteur ou à un activateur pourtant classique des oxydases, laisse planer un doute légitime sur la réalité de cette activité enzymatique. Aussi est-on en droit de se demander s'il ne s'agit pas d'une activité pseudo-oxydasique imputable au seul cuivre, plus ou moins réintégré dans ses propriétés ioniques, en raison des dénaturations subies par les molécules cuproprotéiques. La coexistence des activités oxydasiques et peroxydasiques au sein des mêmes fractions cuproprotéiques peut être interprétée dans ce sens car les peroxydases sont généralement des ferroprotéines dérivées d'hèmes. Tel n'est pas le cas de l'hémocyanine, protéine cuprique apparemment dépourvue de groupement prosthé-

tique. Ainsi se trouve posé le problème de la nature de cette activité peroxydasique déterminée par des cuproprotéines. La même ambiguïté se retrouve à propos de l'activité catalasique, généralement imputable, elle aussi, à des ferroprotéines. Toutefois, dans ce cas, il est difficile d'attribuer cette propriété de certaines fractions cupriques à leur éventuelle dénaturation puisqu'une telle activité peut être mise en évidence sur du sérum fraîchement prélevé.

Il résulte de ces faits que la nécessité d'une étude plus approfondie des propriétés enzymatiques de l'hémocyanine s'avère impérieuse.

## II. ÉTUDE IMMUNOÉLECTROPHORÉTIQUE DU SÉRUM DE *M. PUBER* MÂLE.

L'électrophorèse se prête mal à un dénombrement, même approximatif, des différents constituants d'un mélange complexe comme le sérum des Crustacés Décapodes. Une même substance présentant diverses variétés moléculaires peut apparaître sur les électrophorégrammes, sous l'aspect de plusieurs fractions distinctes ; c'est le cas des isoenzymes ou de pigments respiratoires, tels que l'hémocyanine. Inversement, une fraction apparemment homogène, résulte souvent de l'union de plusieurs constituants possédant des mobilités électrophorétiques voisines. Aussi est-il nécessaire de recourir à des méthodes d'analyse plus discriminantes.

La découverte par Oudin (1946), de l'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié, permet l'application de la réaction de précipitation au problème du dénombrement des substances antigéniques présentes dans une solution. Avec cette méthode ou sa variante (Ouchterlony, 1948), le nombre de lignes de précipité, qui apparaissent lorsqu'on confronte un mélange complexe avec son anti-sérum homologue, est égal ou, plus généralement, inférieur au nombre d'antigènes présents dans le mélange. Le chiffre obtenu ne constitue donc, dans la plupart des cas, qu'une approximation mais il se rapproche d'autant plus de la réalité que les différents antigènes de la solution ont été mieux individualisés avant d'être mis en contact avec l'immunsérum de référence. C'est cette dernière considération qui a amené Grabar et Williams (1953, 1955) à faire précéder la réaction immunochimique proprement dite d'une électrophorèse préalable du mélange étudié. La répartition des lignes de précipité sur les immuno-électrophorégrammes dépend alors de deux caractéristiques propres à chacun des antigènes du mélange : sa mobilité électrophorétique, sa spécificité immunochimique. Cette analyse immunoélectrophorétique appliquée à l'étude de la composition du sérum de *M. puber* mâle a permis une première évaluation du nombre de ses constituants protéiques.

Les immunsérums ont été obtenus en injectant les protéines du sérum total préalablement lyophilisées et redissoutes dans du sérum physiologique, à des lapins de la race dite « Géant des Flandres ». Le

protocole d'immunisation sera décrit en détail dans une publication ultérieure.

Lorsqu'un sérum de *M. puber* mâle est confronté en gel d'agarose à un immunosérum homologue, plusieurs arcs de précipitation commencent à apparaître vingt-quatre heures après le début de la réaction immuno-chimique. Ils sont surtout nombreux à la hauteur des fractions les plus rapides qui sont de nature cuproprotéique. Les extrémités de la plupart d'entre eux se coupant nettement, chacun de ces arcs indépendants, même s'il s'étend parallèlement aux emplacements de plusieurs fractions successives, représente un système antigène-anticorps particulier. Il existe donc, dans le sérum des *M. puber* mâles, plusieurs antigènes de nature différente. Lorsque le sérum examiné est très concentré, leur dénombrement exact s'avère malaisé car les lignes de précipitation forment des enchevêtrements denses au sein desquels leur individualité est difficilement perceptible, les parties juxtaposées des arcs pouvant même fusionner sur la portion de trajet qui leur est commune. Dans de tels cas, la dilution de ces sérums fortement chargés en protéines, préalablement à leur examen, constitue un moyen commode de faciliter le dénombrement de leurs constituants. Mais cette opération, si elle rend plus lisibles les immunoélectrophorégrammes, entraîne par contre l'effacement des constituants présents en faibles quantités dans le sérum. Il y a donc un juste milieu à respecter entre une concentration trop forte et une dilution trop poussée. En fait, il n'existe pas, des expériences préliminaires l'ont prouvé, de dilution optimale qui permette la réalisation d'immunoélectrophorégrammes où tous les constituants protéiques d'un sérum de Crustacé soient à la fois présents et distincts. Le mieux est alors d'examiner chaque sérum étudié à deux dilutions différentes. La première, faible ou nulle, permet le dénombrement des substances présentes en faibles quantités ; la seconde, nettement plus grande, rend possible celui des constituants trop concentrés aux faibles dilutions.

Une particularité inhérente à la physiologie des Crustacés rend toutefois impossible le choix de deux dilutions standards applicables à l'examen du sérum de n'importe quel spécimen de *M. puber*. Le sérum de Crustacés venant de muer est en effet moins riche en protéines que celui de Crustacés préparant une nouvelle exuviation et cela tant du point de vue qualitatif que quantitatif. Aussi, la détermination des dilutions à utiliser est-elle une affaire de stade, voir d'étape. Ces dilutions doivent être fixées, pour chacune de ces phases, en tenant compte des données recueillies au cours d'expériences préliminaires. Un premier essai de dénombrement des constituants protéiques du sérum a été réalisé en appliquant ce principe. Les sérums étudiés provenaient pour la plupart de crabes parvenus en Do. Ce choix, loin d'être arbitraire, résulte de la place privilégiée qu'occupe cette étape dans le cadre du cycle d'intermue. Avec elle, débute la phase exuviale durant laquelle s'édifie la trame protéique de la nouvelle carapace. Les constituants protéiques, présents dans le sérum durant cette étape, sont de ce fait plus nombreux qu'aux stades antérieurs, mais la charge en protéines étant moins importante qu'aux stades ultérieurs, les immunoélectrophorégrammes, obtenus avec ces sérums, sont plus lisibles. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des concentrations égales au tiers et au vingtième de la concentration originelle. Les constituants dénombrés dans chacun de ces cas sont respectivement au nombre de

23 et 15 (Planche 2, C et Fig. 1). On peut donc admettre en première approximation que le nombre moyen des constituants protéiques présents dans le sérum des *M. puber* mâle est au moins égal, sinon supérieur, à 23.

Divers essais ont été entrepris afin de les mieux différencier. La répartition des arcs de précipitation étant consécutive à la dispersion des antigènes dans la masse du support, la séparation de ces substances a été accrue préalablement à la réaction immunochimique par le recours à trois procédés distincts.

— En substituant des supports sélectifs (gel de Sephadex G 200-agarose-amidon ou d'acrylamide-agarose) au gel d'agarose utilisé par Grabar et Williams. Mais les propriétés filtrantes qui sont si utiles lors de la résolution des protéines sériques, constituent un sérieux handicap durant la phase immunochimique proprement dite. Ces propriétés entravent la libre progression des molécules d'antigènes et d'anticorps, alors que celle-ci devrait pouvoir être totale. Pour remédier à cet inconvénient, les deux phases de l'analyse immunoélectrophorétique ont été dissociées et réalisées sur des supports différents : l'électrophorèse sur support sélectif, la réaction immunochimique sur support non sélectif, en l'occurrence l'agarose. Le nombre des constituants antigéniques révélés par ce procédé est inférieur à celui que mettent en évidence les immunoélectrophorégrammes classiques. Cela est vraisemblablement dû au fait que l'électrophorèse séparative étant effectuée sur un support sélectif, les antigènes sont, préalablement à leur diffusion, contenus dans un gel présentant des propriétés filtrantes complexes. En effet, le Sephadex freine la progression des petites molécules et l'amidon celle des grosses. Aussi, seules les substances dont les molécules présentent une taille intermédiaire, passent facilement dans le gel d'agarose qui circonscrit le premier substrat et peuvent rencontrer leurs anticorps homologues. Les autres voient leur cheminement plus ou moins retardé et, à l'extrême, celui-ci peut même être bloqué, ce qui rend impossible leur rencontre avec les anticorps correspondants.

— En rendant la distribution des antigènes discontinue. Pour ce faire, des pastilles de gel sont prélevées sur l'emplacement des principales fractions protéiques d'un électrophorégramme de sérum, puis incluses dans un gel d'agarose. Les pastilles contenant les antigènes sériques peuvent être disposées soit parallèlement à la gouttière des anticorps, soit en cercle autour d'un réservoir cylindrique (technique d'Ouchterlony). Il est ainsi possible de dénombrer les divers constituants antigéniques présents dans chacune des fractions séparées par électrophorèse et, dans le second cas, d'évaluer le degré d'affinité structurale existant entre les différents antigènes.

— En effectuant deux électrophorèses successives. La première détermine la séparation des protéines sériques et permet de prélever les antigènes au niveau de fractions bien définies. La seconde replace les protéines aux emplacements qu'elles occupent normalement sur les électrophorégrammes entiers. On réalise ainsi une dissociation plus poussée de l'enchevêtrement d'arcs de précipitation qui apparaît à hauteur des fractions cuproprotéiques, sur les immunoélectrophorégrammes réalisés selon le procédé de Grabar et Williams. Cela permet



WALTER GHIDALIA

# PLANCHE 1

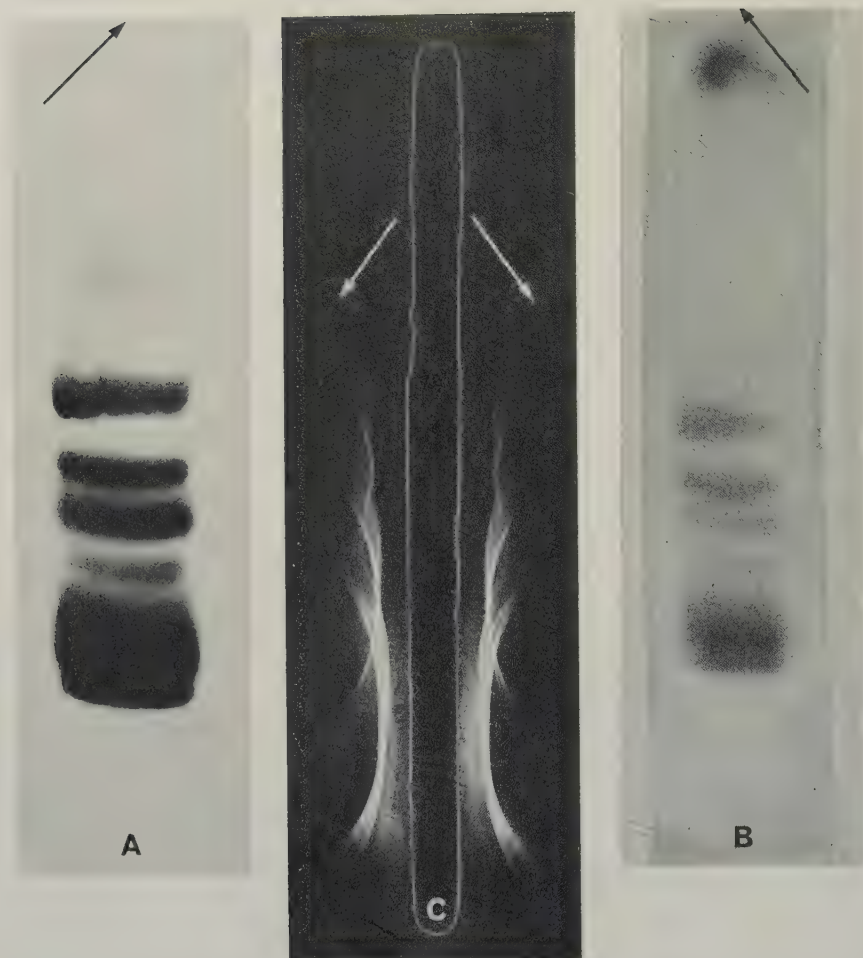
Immunoélectrophorégrammes réalisés en double substrat :

- Electrophorèse en gel de Sephadex G 200 - agarose - amidon et en tampon véronal ;
- Analyse immunochimique en gel d'agarose.

A : d'un extrait hypodermique ; B : d'un extrait alcool-boraté de téguments durs ; C : d'un sérum témoin.

Concentration en anticorps : 20 mg de matières sèches par ml.

Les flèches indiquent les emplacements de dépôt des produits.



WALTER GHIDALIA

## PLANCHE 2

A-B : Electrophorégrammes en gel de Sephadex G 200-agarose-amidon et en tampon tris-glycine d'un même sérum de *M. puber* mâle (stade Do) traités :

A : par le Noir Amido 10 B (protéines); B : par l'acide rubéanique (cuproprotéines).

C : Analyse immunoélectrophorétique d'un sérum de *M. puber* mâle (Do) dilué au 1/20. Concentration en anticorps : 20 mg de matières sèches par ml. Substrat : gel d'agarose. - Tampon : véronal.

Les flèches indiquent les emplacements de dépôt du sérum.

de rapporter les antigènes qui constituent ces arcs à des fractions protéiques bien déterminées.

La combinaison de ces différents procédés a permis de dégager de cette étude immunoélectrophorétique, un certain nombre de conclusions concordantes.

1° Une comparaison entre électrophorégrammes et immunoélectrophorégrammes correspondants prouve que la séparation par électrophorèse des constituants sériques n'est pas totale et qu'elle aboutit très souvent à l'individualisation de fractions hétérogènes. C'est ainsi

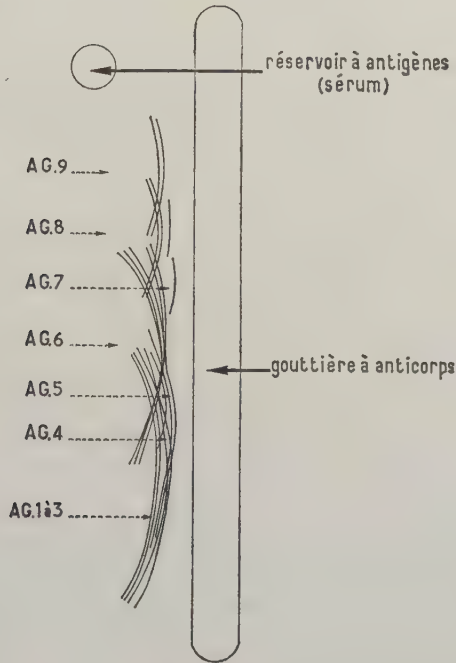


FIG. 1

Analyse immunoélectrophorétique d'un sérum de *M. puber* mâle (Do) dilué au 1/20.

Concentration en anticorps : 20 mg de matières sèches par ml. - Substrat : gel d'agarose. - Tampon : véronal. Les notations AG 1 à AG 9 désignent les principales fractions protéiques qui apparaissent sur les électrophorégrammes réalisés sur ce substrat.

que l'apparition de plusieurs arcs de précipitation en face de la plupart des fractions séparées par électrophorèse, montre que plusieurs protéines immunologiquement différentes, participent à leur constitution.

2° Certaines des protéines sériques, probablement pas toutes cupriques, semblent présenter plusieurs variétés moléculaires. En effet, l'existence d'arcs de précipitation composés témoigne de la présence de sites antigéniques identiques au sein de fractions électrophorétiques distinctes.

3° La présence, sur les immunoélectrophorégrammes de sérum de *M. puber* mâle d'environ 23 arcs de précipitation indépendants,

les uns simples, les autres composés, prouve l'existence de plusieurs protéines sériques immunologiquement différentes. Une telle conclusion est vraisemblablement applicable aux autres Décapodes. Frentz et Veillet (1959) avaient déjà mis en évidence par analyse immunoélectrophorétique six constituants antigéniques distincts dans le sérum de *Carcinus maenas* mâle.

En conséquence, la thèse suivant laquelle l'hémocyanine est la seule protéine sérique, ou sa variante qui la considère comme l'unique cuproprotéine sérique, apparaissent insoutenables à la lumière de ces faits.

### III. L'IMMUNOCHIMIE SYSTÉMATIQUE APPLIQUÉE AUX CRUSTACÉS.

Les techniques immunochimiques fournissent à la systématique un moyen efficace d'asseoir sur des bases biochimiques les classifications généralement établies sur des critères morphologiques ou physiologiques. Aussi, furent-elles très fréquemment utilisées à cette fin depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle.

Les précipitations en tube et interfaciale (ring-test) constituent les procédés les plus couramment employés. Dans les deux cas, le principe est le même, des quantités décroissantes d'antigène sont ajoutées à une quantité constante d'immunsérum afin de déterminer la dilution extrême à laquelle celui-ci est encore capable de réagir avec les antigènes testés. Une comparaison entre les valeurs limites pour lesquelles cette réaction se produit lorsqu'un immunsérum de référence est confronté avec son antigène homologue, d'une part et à divers antigènes hétérologues, d'autre part, rend possible l'appréciation du degré de parenté systématique existant entre les organismes dont proviennent les antigènes.

Mais Boyden (1942), se livrant à une analyse de ces procédés, remarquait à juste titre que les résultats qu'ils fournissaient, n'étaient pas véritablement quantitatifs et que le facteur ainsi déterminé n'était que le titre de l'anti-sérum utilisé, c'est-à-dire sa sensibilité vis-à-vis d'un antigène donné. Aussi a-t-il préféré utiliser la réaction de précipitation quantitative mise au point par Heidelberger et Kendal. Dans cette technique, la quantité de précipité formé, évaluée en poids, volume ou teneur en azote, permet de chiffrer l'intensité de la réaction. Les similitudes structurales existant entre différents antigènes peuvent ainsi être évaluées quantitativement car un antigène quelconque, mis en présence d'un immunsérum, détermine l'apparition, dans le milieu de réaction, d'une quantité de précipité variable ou nulle selon les cas. Cette quantité est d'autant plus importante que la structure de l'antigène testé est plus proche de celle de l'antigène homologue de l'immunsérum de référence. Ainsi, lorsque des antigènes extraits de tissus ou d'humeurs de différentes espèces plus ou moins apparentées entre elles sont mis en présence d'un immunsérum déterminé, un parallélisme très net apparaît entre les quantités de précipité formé dans

chacun des cas et les positions systématiques respectives de ces espèces. Le degré d'affinité existant entre les représentants de différentes unités systématiques devient ainsi mesurable. Mais, pour que les résultats ainsi obtenus puissent être considérés comme valables, il faut que la totalité du précipité recueilli puisse être rapporté en toute certitude à un seul couple antigène-anticorps. Une comparaison qui porterait sur plusieurs couples n'aurait aucun sens en l'état actuel de la technique utilisée car dans un milieu de réaction hétérogène, il serait impossible de chiffrer la fraction du précipité total qui revient à chacun d'eux. Aucune évaluation quantitative ne serait alors possible.

Le sérum des Crustacés, longtemps considéré comme une solution d'hémocyanine, constituait dans cette optique un matériel de choix pour établir une classification de ce groupe, basée sur la structure du pigment respiratoire. Aussi, de nombreux travaux d'immunochimie lui ont-ils été consacrés. Toutefois, bien que les techniques immuno-chimiques aient été appliquées aux Crustacés dès 1904 (Graham-Smith), soit sept ans à peine après la découverte de la réaction de précipitation, ce n'est qu'à partir de 1939 seulement qu'elles furent utilisées de manière suivie à des fins systématiques. Cette application fut essentiellement l'œuvre de chercheurs de la Rutgers' University, au premier rang desquels il convient de placer Boyden et son élève Leone. Le premier a élaboré un protocole expérimental minutieux que le second a utilisé pour tenter de définir les affinités taxonomiques existant entre de nombreux genres et espèces de Crustacés Décapodes.

Ce protocole présente apparemment deux avantages notables.

a) *Rigueur et simplicité de la conception théorique.* Pour un système déterminé, la quantité de précipité formé n'est maximum que pour certaines valeurs du rapport antigène/anticorps. On conçoit dès lors que comparer par précipitation quantitative différents antigènes n'a de sens que si les résultats ont été obtenus pour chacun d'eux avec ces rapports optimums. Cela implique la réalisation préalable, pour les différents antigènes testés, de la courbe qui traduit les variations quantitatives du précipité en fonction des diverses valeurs du rapport antigène/anticorps. Afin de simplifier les opérations et de rendre comparables entre eux les résultats, Boyden préfère mesurer la réactivité totale des antigènes étudiés. Il désigne ainsi la somme des précipités recueillis lorsqu'on confronte un antigène à un immun-sérum et que l'on fait varier leurs proportions relatives. Dans cette méthode, les parentés systématiques se déduisent alors du rapport entre les sommes des valeurs trouvées pour la réaction homologue d'une part et chacune des réactions hétérologues d'autre part.

b) *Rapidité des mesures.* Dans la technique d'Heidelberger et Kendal, la mesure du précipité nécessite une longue suite de manipulations délicates destinées à permettre une récupération aussi totale que possible du dépôt formé. Dans le procédé de Boyden par contre, l'évaluation se fait au moyen d'une technique néphélométrique (emploi du photoréfléctomètre de Libby 1938). La mesure de la réactivité totale s'effectue en une heure, ce qui constitue un avantage notable, si l'on compare ce temps aux 48 heures que nécessite la même opération lorsqu'on l'effectue selon la technique d'Heidelberger et Kendal.

Mais, aussi séduisante qu'apparaisse cette méthode, il faut recon-

naître que son application à la systématique des Crustacés a abouti, dans les conditions où on l'a effectuée jusqu'ici, à des résultats pour le moins discutables. En effet, le reproche capital que l'on peut formuler à l'encontre de la quasi-totalité des recherches immunochimiques consacrées à ce sujet, est l'inadéquation au but poursuivi du matériel employé. L'utilisation de la réaction de précipitation quantitative n'est légitime, on l'a vu précédemment, qu'appliquée à l'étude d'un seul couple antigène-anticorps. Or, toutes les analyses immunoélectrophorétiques déjà réalisées avec du sérum de Crustacés, ont prouvé de façon formelle, l'existence de nombreux constituants sériques immunologiquement différents. Il apparaît ainsi que la condition primordiale : existence d'un seul système antigène-anticorps dans le milieu de réaction, qui seule légitime l'application de la réaction de précipitation quantitative à la systématique d'un groupe, n'est pas respectée, dans le cas de Crustacés, lorsque la solution antigénique employée pour cette étude est constituée par du sérum. Tout au plus peut-on espérer obtenir ainsi un résultat global portant sur plusieurs systèmes antigène-anticorps, à condition toutefois d'avoir pris la précaution d'expérimenter sur des animaux parvenus aux mêmes stades du cycle d'intermue.

Néanmoins, des risques d'erreur importants subsistent toujours car il est possible que les quantités de précipité recueillies ne soient pas proportionnelles au nombre d'antigènes qui ont contribué à leur formation. Un précipité abondant peut être le produit d'une seule protéine et, inversement, un faible précipité celui de plusieurs antigènes. En conséquence, il est préférable d'attendre, avant d'appliquer à nouveau la précipitation quantitative à la systématique des Crustacés, que l'hémocyanine ait été obtenue à l'état pur.

Il demeure toutefois possible actuellement d'apprécier de manière approximative les affinités immunochimiques existant entre des groupes systématiques distincts, en se référant au nombre d'antigènes qui leur sont communs. L'analyse immunoélectrophorétique qui, en l'état présent des techniques, constitue le procédé le plus efficace pour individualiser les divers constituants d'un milieu hétérogène, se prête particulièrement bien à un tel dénombrement. Pour ce faire, il suffit de confronter par cette technique un immunsérum de référence à plusieurs solutions antigéniques hétérologues et de compter les lignes de précipitation qui apparaissent dans chacun des cas. La parenté systématique entre les espèces ainsi étudiées et celle ayant fourni la solution antigénique homologue est d'autant plus grande que le nombre de lignes de précipité est plus important. Une variante de ce procédé consiste à utiliser des immunsérums préalablement épuisés par des sérums hétérologues.

Des recherches sont actuellement en cours pour tenter de préciser au moyen de ces techniques, les affinités existant entre trois espèces de Crabes : *Macropipus puber*, *Carcinus maenas* et *Cancer pagurus*.

En conclusion, il ressort de cette étude :

— que la composition du sérum des Décapodes apparaît aussi complexe que celle des sérums des Vertébrés supérieurs. 15 à 20 constituants différents ont pu être mis en évidence sur les électrophorogrammes de *M. puber* mâle et 23 sur les immunoélectrophoré-

grammes réalisés selon la technique de Grabar et Williams. Dans les deux cas, il s'agit d'ailleurs d'un nombre par défaut, car seuls ont été pris en considération les constituants qui se distinguaient nettement et se retrouvaient sur la plupart, sinon la totalité, des plaques examinées ;

— que l'existence de nombreux constituants sériques immunologiquement différents rend inapplicable, à l'étude taxonomique de ce groupe, la technique de précipitation quantitative. L'analyse immunoélectrophorétique de Grabar et Williams qui permet l'individualisation des antigènes présents dans les sérums examinés, apparaît plus appropriée à cette fin ;

— que la plupart des propriétés attribuées jusqu'ici à l'hémocyanine sont probablement communes à plusieurs cuproprotéines. En conséquence, l'identification de ce pigment nécessite la découverte de nouvelles caractéristiques qui lui soient plus spécifiques. Cela apparaît d'autant plus nécessaire que l'hémocyanine n'est pas vraisemblablement la seule cuproprotéine présente dans le sérum des Crustacés.

Chez les Vertébrés supérieurs, le pigment respiratoire et certaines des métallo-protéines impliquées dans les processus d'oxydo-réduction sont à base de fer, la pluralité des constituants cuproprotéiques du sérum des Crustacés correspond, peut-être, à un phénomène du même ordre, mais centré cette fois sur le cuivre.

### Summary

Electrophoretical and immunochemical study of the serum of a Crustacean Decapoda *Macropipus puber* (Linné). Application to the systematical immunochemistry of Crustaceans.

The electrophoretical and immunochemical study of the serum of *Macropipus puber* (Linné), a decapod crustacean, reveals about 23 proteic components, which are immunologically different. Several of them contain copper, but they seem not to be all of the hemocyanic kind.

The technique of quantitative precipitation, the most frequently utilised immunochemical process for the taxonomical study of Crustaceans, seems inadequate, because this technique cannot be utilised for the study of complex mixtures. The immuno-electrophoretical analysis of Grabar and Williams seems to be more convenient for this study.

### Zusammenfassung

Elektrophoretische und immunochemische Untersuchung des Serums eines Zehnfüßlers *Macropipus puber* (Linné). Anwendung der systematischen Immunochemie auf die Crustaceen.

Die elektrophoretische und immunochemische Untersuchungen des Serums des Zehnfüßlers *Macropipus puber* (Linné) haben gestattet, ungefähr 23 Proteine nachzuweisen, die alle immunologisch verschieden sind. Mehrere der Bestandteile enthalten Kupfer, aber sie scheinen nicht alle haemocyanischer Natur zu sein.

Die quantitative Fällungstechnik, die bisher für das taxonomische Studium der Schalentiere am häufigsten verwendete Prozess, scheint infolgedessen inadäquat, da sie für das Studium komplexer Mischungen nicht verwendet werden kann. Die immuno-elektrophoretische Analyse nach Grabar und Williams ist für eine solche Untersuchung vorzuziehen.

## INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ALLISON, J.B. et COLE, W.H., 1940. — The nitrogen, copper and hemocyanin content of the sera of several Arthropods. *J. Biol. Chem.*, 135, pp. 259-265.
- BLUMBERG, W.H., EISINGER, J., AISEN, P., MORELL, A.G. et SCHEINBERG, H., 1963. — Physical and chemical studies on ceruloplasmin. I the relation between blue color and the valence states of copper. *J. Biol. Chem.*, 238, pp. 1675-1682.
- BOYDEN, A.A., 1942. — Systematic serology. A critical appreciation. *Physiol. Zool.*, 15, pp. 109-145.
- BROHULT, S. et BORGMAN, K., 1944. — L'hémocyanine d'*Helix pomatia* est-elle composée de deux espèces de molécules ? *The Svedberg, 1844-1944*, p. 429, Almqvist et Wiksels Ed., Uppsala, Stockholm.
- BURK, N.F., 1940. — Osmotic pressure, molecular weight and dissociation of *Limulus* hemocyanin. *J. Biol. Chem.*, 133, pp. 511-520.
- CLARK, E. et BURNET, F.M., 1942. — The application of serological methods to the study of Crustacea. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc. Adelaide*, 20, pp. 89-95.
- COWDEN, R.R. et COLEMAN, J.R., 1962. — A starch gel electrophoretic study of the hemolymph proteins of some Bermuda Crustacea. *Experientia*, 18, 6, pp. 265-266.
- DHERE, C., 1920. — Recherches sur l'hémocyanine (Cinquième mémoire). IV. Spectre d'absorption ultra-violet de l'oxyhémocyanine. *J. Physiol. Path. Gén.*, 18, pp. 1081-1093.
- FRENTZ, R. et VEILLET, A., 1959. — Etude immunoelectrophorétique des protéines du sérum de *Carcinus maenas* Pennant. *Proceed. XVth Int. Congr. Zool. London*, 1958, pp. 555-557.
- GHIRETTI, F., 1956. — The decomposition of hydrogen peroxide by hemocyanin and by its dissociation products. *Arch. Biochem. Biophys.*, 63, pp. 165-176.
- GOODWIN, T.W., 1960. — Biochemistry of pigments. In "Physiology of Crustacea", Acad. Press, New York, London.
- GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A., 1953. — Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunologiques d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. *Biochem. Biophys. Acta*, 10, pp. 193-194.
- GRABAR, P. et WILLIAMS, C.A., 1955. — Méthode immunoelectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. *Biochem. Biophys. Acta*, 17, pp. 67-74.
- LAFON, M., 1948. — Nouvelles recherches biochimiques et physiologiques sur le squelette tégumentaire des Crustacés. *Bull. Inst. Océan. Monaco*, n° 939.
- LIBBY, R.L., 1938. — The photoreflectometer. An instrument for the measurements of turbid systems. *J. Immunol.*, 34, pp. 71-73.
- LONTIE, R. et WITTERS, R., 1966. — *Helix pomatia* hemocyanins. In "The biochemistry of copper", Acad. Press, New York, London.
- MANWELL, C. et BAKER, C.M., 1963. — Starch gel electrophoresis of sera from some marine Arthropods: studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "ceruloplasmin-like protein". *Comp. Biochem. Physiol.*, 8, pp. 193-208.
- NAKAMURA, T. et OGURA, Y., 1966. — Characteristics of the state of copper in *Rhus* laccase. In "The biochemistry of copper", Acad. Press, New York, London.
- OUCHTERLONY, O., 1948. — Antigen antibody reaction in gels. *Ark. Kemi. Miner. Geol.*, B 26, n° 16.
- ODIN, J., 1946. — Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 222, pp. 115-116.
- RAWLINSON, W.A., 1940. — Crystalline hemocyanins: some physical and chemical constants. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sc.*, 18, pp. 131-140.
- ROCHE, J. et DUBOULOZ, P., 1933. — Etude de la constitution des hémocyanines et des hémérythrine au moyen de leur spectre ultra-violet. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 196, p. 646.
- ROCHE, J. et JEAN, G., 1934. — Recherches sur la composition en acides aminés des pigments respiratoires des Invertébrés (hémocyanines, hémérythrine, chlorocruorines, érythrocrucorines). *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 16, 1, pp. 769-778.
- TRIM, A.R., 1941. — Studies in the chemistry of the Insect cuticle I some general observations on certain Arthropod cuticles with special reference to the characterization of the proteins. *Biochem. J.*, 35, pp. 1088-1098.
- ZUCKERKANDL, E., 1953. — La position stérique du cuivre dans l'hémocyanine et dans les oxydases cupriques. *C.R. Soc. Biol.*, 147, pp. 629-632.
- ZUCKERKANDL, E., 1959. — La non-réactivité du cuivre dans l'hémocyanine intacte. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, XLI, 12, pp. 1629-1648.



